

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Biológia Doktori Iskola

A kapszuláris poliszacharid bioszintézis és a 16-3 bakteriofág receptor *Sinorhizobium meliloti* 41 baktériumban

Ph.D. értekezés tézisei

Pálvölgyi Adrienn

Témavezető:
Dr. Putnoky Péter
egyetemi tanár



PÉCS, 2009.

BEVEZETÉS

A rhizobiumokhoz tartozó *Sinorhizobium meliloti* baktérium és a pillangósvirágú lucerna növény (*Medicago sativa*) közötti szimbiózis a növény-mikróba kapcsolat és a nitrogénkötő szimbiózis egyik fontos modellje. A nitrogénkötő szimbiózis kialakulásának és működésének jobb megértését szolgálja a folyamatban szerepet játszó bakteriális gének megismerése. A szimbiózis kialakulásának egyik fontos eleme a baktérium felszínén lévő kapszuláris poliszacharid, mely a bakteriofágok elleni védekezés egyik lehetséges eszköze is. Csoportunkban a *S. meliloti* 41 törzs kapszuláris poliszacharidjának szimbiózisban és baktérium-bakteriofág felismerésben betöltött szerepét vizsgáltuk, elsősorban genetikai eszközök segítségével.

Az endoszimbiózist kialakító *S. meliloti* baktérium révén a gazdanövény (lucerna, lepkeszeg, somkóró) szinte kimeríthetetlen nitrogén forráshoz jut. A szimbiózis kialakulása komplex molekuláris jelcserén alapuló folyamat, melyben számos növényi és bakteriális gén működésének összehangolása szükséges. A rhizoszférában található rhizobiumok a gazdanövény által szekretált flavonoidokat érzékelik. A flavonoidok indukálják a Nod-faktor termelését a baktériumokban, mely biztosítja a gazdanövény általi felismerést, amely a gyökérszőrök meggyökösödéséhez és a szimbiotikus gümő kialakulásához vezet. Az invázió során a folyamatosan növekedő infekciós fonal segítségével jutnak el a baktériumok a gyökérszőrsejtekbe, majd végül a gümősejtek belsejébe. Ezután a baktériumok morfológiai változásokon mennek keresztül, ún. bakteroidokká alakulnak és megkezdik a légköri nitrogéngáz ammóniává redukálását a nitrogenáz enzim segítségével.

A rhizobiumok sejtfelszíni poliszacharidjai kulcsszerepet játszanak a szimbiózis kialakulásának lépéseiben: az infekciós fonal növekedésében, a gümő inváziójában, és a gazdaspecifitásban. Számos Gram-negatív baktériumhoz hasonlóan a *S. meliloti* különféle mukoid sejtfelszíni poliszacharidokat termel, melyek szimbiózisban betöltött szerepére különböző infekcióban hibás (Inf-) baktérium mutánsok vizsgálatával derítettek fényt. Az exopoliszacharid (EPS) a külső környezetbe szekretálódik, elfojtja a növényi védelmi választ. A lipopoliszacharid (LPS) az infekció későbbi szakaszában fontos, míg a sejtmembrán körül található kapszuláris poliszacharid (KPS, K-antigén), a szimbiotikus felismerés korai szakaszában jut szerephez.

Számos exopoliszacharid (EPS) termelésben hibás *S. meliloti* törzs nem képes a növény inváziójára, azonban leírtak olyan exopoliszacharidot nem termelő törzseket is, amelyek képesek szimbiózist létrehozni. Ennek oka az, hogy ezek a baktériumok olyan törzsspecifikus kapszuláris poliszacharidot termelnek (a K_{R5} antigént), amely képes ellátni az EPS (szukcinoglükán) invázióban betöltött szerepét. A K_{R5} antigén szerkezetét és bioszintézis génjeit nemrégiben

tisztázták. Rendelkezik kis (LMW) és nagy (HMW) molekulatömegű komponensekkel, mely diszacharid alegységekből épül fel. Az alegység egy glükuronsavból (GlcA) és egy pszeudaminsavból áll, melyen 7-N-acetil és 5-N- β -hidroxibutiril módosítások is találhatóak ([5-OHBut, 7-NAcPse)-GlcA]). Szintézisében három géncsoport vesz részt, ezek az *rkp-1*, *rkp-2*, és *rkp-3* régiók.

Az *rkp-1* régióban található gének feladata - a feltételezések szerint - a K-antigén bioszintéziséhez szükséges lipid hordozó létrehozása (*rkpABCDEF*), továbbá a lipidhordozó lipofil molekuláinak módosítása és transzportálása (*rkpG-J*). A régióban nincsenek olyan gének, melyeknek a cukoralegységek bioszintézisében vagy a KPS polimerizációjában lenne szerepük.

Az *rkp-2* régió két olyan génnel rendelkezik (*rkpK*, *lpsL*), melyek a vad típusú LPS kialakításához szükségesek, de az RkpK fehérje a KPS bioszintézis útvonalnak is fontos eleme, az UDP-glükóz UDP-glükuronsavvá oxidálását katalizálja.

Az előzőekben említett géncsoportok általánosan előfordulnak a *Sinorhizobium* genusban, ezzel szemben az *rkp-3* régiót eddig csak a *S. meliloti* 41 (RM41) törzsben azonosították. Az *rkp-3* régió a pRme41c (pSymB) megaplazmidon található és számos poliszacharid bioszintézis gént hordoz. Az *rkpLMNOPQ* gének feltételezett funkciója a pszeudaminsav bioszintézise a KPS polimer számára. Az említett géncsoport horizontális géntranszfer útján kerülhetett a genomba, mely jelenség jellemző más rhizobium génre is. Az *rkpR*, *rkpS*, *rkpT* gének olyan fehérjéket kódolnak, melyek a KPS polimer transzportját végző fehérjékkel mutatnak homológiát. Az említett gének viszont nincsenek hatással a KPS szintézisére vagy a szimbiózisra. A régió utolsó génje a polimerizáció szabályozását biztosító *rkpZ*, mely a KPS LMW formájának termelését teszi lehetővé. Az *rkp-3* régió még ismeretlen szekvenciájú jobb oldalán izolálták a *rkpY*-t, mely által kódolt fehérje nem mutat homológiát más ismert fehérjével és a gén mutációjakor megszűnik a K_R5 antigén bioszintézise és egy még ismeretlen, kis molekulatömegű (LMW PS) poliszacharid termelődik.

A sejtfelszíni struktúrák tanulmányozásában, a bioszintézis gének azonosításában fontos eszközök lehetnek a törzsspecifikus bakteriofágok. Így a K_R5 antigén esetében a 16-3 bakteriofág, mely a *Sinorhizobium meliloti* 41 törzs temperált, speciális transzdukáló fágja. A már említett Inf- mutánsok esetében megfigyelték, hogy a KPS részleges vagy teljes hiánya mellett a 16-3 fággal szemben is rezisztenciát mutattak. Ezek alapján arra következtettek, hogy a fágreceptor jelenléte és a poliszacharid bioszintézise összefügg, vagyis maga a K_R5 antigén szolgálhat receptorként a bakteriofág számára. A jelenség lehetőséget adott további KPS bioszintézis gének és a fágreceptor alkotóinak megismerésére, melyre a receptorhibás baktériumok és a host-range fágmutációk azonosítására kidolgozott mutánsizolálási módszer alkalmazható.

CÉLKITŰZÉSEK

A munkám főbb célkitűzései a következők voltak:

1. A K_R5 antigén bioszintézis jobb megismerése, a baktérium-növény és a baktérium-bakteriofág kapcsolat jellemzése céljából.
2. A teljes *rkpY* régió szekvenciájának meghatározása és bioinformatikai elemzése.
3. Az *rkpY* gén és a régió egyéb feltételezett génjeinek funkcionális elemzése genetikai és biokémiai eszközökkel.

MÓDSZEREK

Baktériumok, bakteriofágok szaporítása

Munkánk során számos mutáns baktériumtörzset, bakteriofágot hoztunk létre. A *S. meliloti* törzseket komplett TA vagy GTS (minimál) táptalajokon, 28°C -on szaporítottuk. Az *Escherichia coli* törzseket pedig LB tápközegben 37°C-on növesztettük a megfelelő antibiotikum mellett. A transzkonjugánsok és transzformáns baktériumok szelekciója szintén antibiotikumok segítségével történt. Transzformálás során *E.coli* XL1-Blue és DH5 α törzseket használtunk. A rekombinációs DNS technikák és szekvencia meghatározások során, pBluescriptII SK(+), pUC19, pBBR1-MCS2, pBBR1-MCS5 és pPAG160 vektorokat alkalmaztunk. A 16-3 fág felszaporításához a vad típusú *S. meliloti* 41 (RM41) baktérium törzset használtuk. A szaporítás során nyert fágglizátumban meghatároztuk a fágszámot (titert), ami általában 10^9 - 10^{10} PFU/ml értékű volt.

Fágreceptor mutánsok izolálása, a mutáns gének azonosítása

Olyan mutánsizolálási eljárást alkalmaztunk, melynek során a *S. meliloti* 41 törzsre specifikus 16-3 bakteriofágot használtuk szelekciós eszközként. A fágrezisztens baktérium mutánsok között azokat kerestük, melyek felszínén a receptor nem tűnt el, csak módosult, vagyis host-range fágot tudtunk izolálni rajtuk. A host-range mutáció a fág baktériumfelszínt felismerő farkirost fehérjéjét kódoló gén mutációja.

A baktérium génmutációk helyének azonosítását komplementációs kísérletekkel végeztük. A receptorhibás baktériumokba olyan kozmid klónokat jutattunk be konjugáció segítségével, melyek vad típusú és Tn5 inszerciókat tartalmazó *rkp* génrégiókat hordoztak. A transzkonjugáns baktériumok rezisztenciáját vad típusú 16-3 fággal szemben vizsgáltuk. Ha a vad típusú kozmid klón képes volt helyreállítani a fágérzékenységet, az azt jelentette, hogy a bejuttatott génrégió tartalmazta a mutáns gén vad típusú allélját. Ha a kozmid, mely Tn5 inszerciót tartalmazott egy adott génben és gátolta a komplementációt, az a 16-3 fág rezisztencia megmaradását okozta. Ez

azt feltételezte, hogy a Tn5 inszerció abban a génben található, mely a baktériumban a mutációt hordozza.

Az *rkpM*₄₀₄₆ allél bázissorrendjének eltérését szekvencia meghatározással vizsgáltuk. A mutáns baktérium folyadék kultúrájából összes DNS preparátumot készítettünk fenol-kloroformos módszerrel. A preparátumból az *rkpM* gént magába foglaló DNS-szakaszt sokszoroztuk fel polimeráz láncreakcióval (PCR). Az így nyert DNS fragmentet izoláltuk, majd szekvenáló primerek segítségével meghatároztuk bázissorrendjét.

Az *rkpY*₄₀₇₃ mutációt szubfragmentek konjugációjával határoltuk be, ún. marker rescue kísérletben. A vad típusú *rkpY* gén restrikciós emésztéssel nyert három szubfragmentjét konjugatív plazmidba építettük, majd a mutáns baktériumba juttattuk. A homológ rekombinációval létrejött vad típusú transzkonjugánsokat fágérzékenységi teszttel ellenőriztük az *M1* fággal szemben. Megfigyeltük, hogy a *S. meliloti* 1021 *M1* fágja képes fertőzni az *S. meliloti* 41 *rkp* mutáns törzseket. A megfelelő *rkpY*₄₀₇₃ allélt tartalmazó szubfragment szekvenciáját az előzőekben leírtak alapján határoztuk meg az erre a DNS szakaszra tervezett primerek segítségével.

Az *rkp-3* régió szekvenciájának kiterjesztése

Az *rkp-3* régió szakaszait tartalmazó pAT401 és pPP2543 kozmidokat restrikciós emésztéssel feldaraboltuk, majd az így kapott szubfragmenteket pBluescript vektorba építettük a megfelelő *in vitro* rekombinációs DNS technika segítségével. A szekvencia meghatározás a BigDyeTerminator Kit segítségével, T7 és T3 primerekkel történt, az Applied Biosystems 373A szekvenáló készüléken. Emellett a Tn5 inszerciókat tartalmazó mutánsok esetében Tn5 specifikus primereket és az ET-KanR-3 inszerciók által a SeqE és SeqW szekvenáló primereket is használtuk. A mindkét DNS szálon meghatározott rész-szekvenciákat számítógépes módszerrel ellenőriztük és illesztettük össze, majd elemeztük gének azonosítása céljából. Az így kapott teljes szekvenciát az EMBL, GenBank és DDBJ nukleotid adatbázisba küldtük (AC: AM849044). A feltételezett gének által kódolt fehérjéket homológia keresésnek vetettük alá az NCBI BlastP programmal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), a funkcionális doménekről a PROSITE adatbázisból gyűjtöttünk információkat (<http://www.expasy.org/>), illetve transzmembrán domének azonosítására a TopPred, DAS (<http://www.sbc.su.se/services/>) és Split 4.0 programot alkalmaztuk (<http://split.pmfst.hr/split/4/>).

Az *rkpY* régió mutagenizálása, mutáns baktériumok előállítása

Az *rkpY* régió feltételezett génjeiben hibás baktériumok előállítását végeztük indirekt transzpozíciós mutagenézis segítségével. Az *rkp-3* régió jobb oldalának DNS fragmentjeit tartalmazó kozmidot (pAT401) illetve plazmidokat *in vitro* mutagenizáltuk a kanamicint

tartalmazó Mu entrancepozon segítségével (TGS II Kit, Finnzymes, Fi). A transzpozonok beépülését fizikai térképezés során határoltuk be, majd a pontos szekvencia szintű beépülést a SeqE és SeqW primerekkel ellenőriztük. A transzpozont tartalmazó megfelelő DNS fragmenteket a konjugatív pPAG160 vektorba építettük át. Az így elkészült pPAG160 konstrukciók konjugálásával hoztunk létre egyszeres és kettős mutáns *S. meliloti* baktérium törzseket. A kointegrát képződés kizárására és a kétszeres rekombinációval létrejött homológ rekombinások igazolására PCR módszert használtunk, a pPAG160 vektor és az érintett gén szekvenciájára tervezett primerekkel.

Deoxikólsav-poliakrilamid gélelektroforézis (DOC-PAGE)

A baktérium törzsek sejtfelszíni poliszacharidjait módosított forró fenolos extrakcióval izoláltuk. A KPS-LPS preparátumot desztillált vízben dializáltuk, majd liofilizálással szárítottuk, végül steril desztillált vízben oldottuk. Az előkészített KPS-LPS preparátumokat 18%-os DOC-PAGE gélen futtattuk BioRad Miniprotean II készülék segítségével. A minták előhívása alciánkék-ezüst festéssel történt. A KPS specifikus elemzés során a gélfestés oxidáció nélkül történt, az LPS elemzésekor nátrium meta-perjodátot használtunk oxidálásra, alciánkék festés nélkül. A géleket UVP BioDoc-It System készülékkel fotóztuk le.

Szimbiotikus növényi teszt

A különböző *S. meliloti* mutáns baktériumok szimbiotikus képességét növényi tesztel ellenőriztük, melyhez *Medicago sativa* L. Nagyszénási növényeket használtunk. Nitrogénmentes növényi táptalajon (GIBSON) steril lucerna csíranövényeket fertőztünk a kiválasztott baktérium törzsekkel, 4-6 nappal a steril kémcsövekbe kiültetést követően. A szimbiózis kialakulását vagy hiányát 4-6 héttel a fertőzés után állapítottuk meg.

EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

Előző eredményeink alapján sejteni lehetett, hogy a KPS bioszintézis és a fágreceptor megléte között összefüggés van. Feltételeztük, hogy a host-range fágmutánsok segítségével izolált speciális receptorhibás baktériumok vizsgálata lehetőséget adhat újabb bioszintézis gének azonosítására. Ezért munkánk első lépéseként, olyan spontán *S. meliloti* baktérium mutánsokat (GH4046, GH4178, GH4180 és PP4073) izoláltunk, melyek a vad típusú 16-3 fággal szemben rezisztensek voltak, azonban host-range fágok izolálására alkalmasak. Feltételeztük, hogy ezekben az esetekben a baktérium felszínén még jelen volt a fág receptor, csak kisebb módosulást szenvedett, mely lehetővé tette a fág farkirost fehérjében mutációt hordozó fágok izolálását is. A továbbiakban a mutációk azonosítását, valamint a sejtfelszíni változások okozta eltérések meghatározását tűztük ki célul.

A 16-3 fágreceptor kialakításában részt vevő fehérjék

A DOC-PAGE vizsgálatok alapján, az új fágrezisztens baktériumok mutációi a K_R5 antigén termelést érintették, ahogyan feltételeztük. Annak kiderítésére, hogy mely *rkp* gén hordoz mutációt a receptorhibás baktériumban, komplementációs kísérleteket végeztünk, az *rkp-1*, *rkp-2*, *rkp-3* régiókat tartalmazó kozmidok külön-külön bejuttatásával. Az *rkp-3* régiót tartalmazó reprezentatív kozmid klónok képesek voltak komplementálni az összes *rkp* mutációt. Ezek alapján sejtettük, hogy a mutációk már ismert génekben találhatóak. A további komplementációs kísérletekben olyan kozmidokat juttatunk be, melyek a régió mutáns származékait tartalmazták. Ezáltal azonosítani tudtuk a baktérium mutációt szenvedett génjét. Eredményeink alapján a GH4046 törzs az *rkpM* génben, a GH4178 és GH4180 törzsek az *rkpZ*, valamint a PP4073 az *rkpY* génben hordoznak mutációt.

Az *rkpM*₄₀₄₆ mutáns DOC-PAGE elemzése meglepő eredményt hozott. Azt feltételeztük, hogy a mutáns baktériumok olyan megváltozott szerkezetű KPS-t termelnek, melyek nem rendelkeznek hidroxibutiril és/vagy acetil módosításokkal. Ennek ellenére a baktérium mutáns egyáltalán nem termel K_R5-antigént. Ezen eredmény szerint a 16-3 fágreceptor nem a K_R5 antigén, mivel a host-range fágok izolálása alapján, az *rkpM*₄₀₄₆ mutáns eltérő fágreceptorral rendelkezik. Érdekes módon a Tn5 inszertciót hordozó *rkpM* mutáns nem lehetett host-range fágokat izolálni, amely arra utalt, hogy a receptor nincs a baktérium felszínén, tehát az *rkpM*₄₀₄₆ egy speciális mutáns allél.

Hasonló eredményt hozott az *rkpY*₄₀₇₃ mutáció elemzése is. Számos spontán és Tn5 inszerció *rkpY* mutáció a fágreceptor hiányát okozta. Csak az *rkpY*₄₀₇₃ mutáns volt alkalmas host-range fágok izolálására, melyből arra következtettünk, hogy a módosult fágreceptor jelen van a baktérium felszínén. Az *rkpY*₄₀₇₃ mutáns törzs egy kis molekulatömegű (LMW PS) poliszacharidot termel a K_R5 antigén helyett, mint kapszuláris poliszacharid.

Az *rkpM*₄₀₄₆ és *rkpY*₄₀₇₃ allélokban a speciális mutáció okán a szekvencia szintű eltéréseket is meghatároztuk. Az *rkpM*₄₀₄₆ allélban egy ún. missense mutáció található, mely során a fehérjében egy leucin (*Leu*₂₅₂) változott fenilalaninná (*Phe*₂₅₂). Az *rkpY*₄₀₇₃ allélban hasonló missense mutáció található, melynek eredményeként az 1024 aminosav hosszúságú RkpY fehérje 552. aminosava leucinről (*Leu*₅₅₂) prolinra (*Pro*₅₅₂) változott. A host-range fágokban is különböző missense mutációkat tudtunk azonosítani, melyek két gént érintettek. Ez a fág farkirost fehérje és a *S. meliloti* 41 K_R5 antigén szintézisében fontos fehérje közötti direkt kapcsolatra utal. Következésképpen valószínűsítjük, hogy az RkpM és RkpZ fehérjék részt vesznek a fágreceptor kialakításában.

Az RkpZ esetében ezt a következtetést nem vonhatjuk le, mivel a Tn5 transzpozont tartalmazó *rkpZ* mutáns is lehetett host-range fágot izolálni.

A fehérje természetű fágreceptorok nem ismeretlenek az irodalomban. Az *E. coli* K-12 törzs malB (lamB) génjének számos missense mutációja a lambda fág felismerési folyamatát akadályozta, és lehetővé tette host-range fágok izolálását. Ezek a fágmutánsok a fág farkirost fehérjéjét kódoló J génben hordoztak különböző missense mutációt. Az *E. coli* baktériumokon izolált ún. K fágok (kapszula specifikus) baktérium felszínét felismerő folyamata két lépésből állhat. A fág először a kapszuláris poliszacharidhoz kötődik, majd azt enzimatikus úton lebontja, végül a DNS-e bejuttatását segítő bakteriális csatornaféhrjét ismeri fel. Eredményeink alapján a *S. meliloti* és a 16-3 fág esetében sem zárható ki ez a lehetőség. Az RkpM és RkpY fehérje a K_R5 antigén bioszintézis elemeként, közvetlenül részt vehet a fágfertőzésben. Azonban az RkpZ szerepe közvetett lehet, melynek megértéséhez további vizsgálatok szükségesek. Nem egyértelmű, hogy az *rkpZ* mutációja miatt termelődő HMW KPS teszi lehetővé a fágmutánsok kötődését vagy az RkpZ hiánya.

Az *rkpY* régió bázissorrendjének meghatározása és elemzése

Az *rkp-3* régió szekvenciájának eddig egy 12821 bp szakasza volt ismert, amely az *rkpLMNOPQ*, *rkpRST*, *rkpZ* géneket tartalmazza, valamint az *rkpY* gént hordozó 5966 bp nagyságú DNS szakasz szekvenciáját is meghatározták. Az *rkp-3* régióban található gének megismerése céljából a teljes régió szekvenciájának meghatározását befejeztük. Ezzel összesen egy 25024 bp hosszú szekvenciává bővült az ismert nukleotid összetételű szakasz. Az újonnan meghatározott szekvencián további feltételezett géneket azonosítottunk az *rkpY* gén mindkét oldalán. Az *rkpZ* és *rkpY* gének között található több ORF, amelyek fehérjetermékei transzpozáz enzimekkel mutatnak homológiát a számítógépes elemzés szerint. Ezek valószínűleg inszerciós elemek részei (ISRm26 és ISRm15), melyek feltehetően két transzpozíciós esemény során épültek be az *rkp-3* régióba. Feltételezhető hogy, az ISRm15 ékelődött az *rkpZ* és *rkpY* gének közé, majd az ISRm26 integrálódott az előző inszerciós elem területére.

Az *rkpY* gén másik oldalán, a régió 3' végén további három ORF-t azonosítottunk: *orf7343*, *orf8077*, *rkpT2*. A továbbiakban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az említett három ORF milyen funkcióval rendelkezhet, hatással vannak-e a K_R5 antigén szintézisre vagy a szimbiozusra. A kérdés megválaszolására, ún. egyszeres és kétszeres baktérium mutánsok létrehozását terveztük.

Az *rkpY* régió genetikai elemzése

Transzpozíciós mutagenézis segítségével mutációkat hoztunk létre az *orf7343*, *orf8077* és *rkpT2* feltételezett génekben. Az így előállított mutáns baktériumok által termelt poliszacharidot elemeztük DOC-PAGE módszerrel, valamint a mutánsokat fágrezisztencia és szimbiotikus aktivitás tekintetében is vizsgáltuk. A kísérleti eredmények alapján azt a következtetést vontuk

le, hogy az *orf7343*, *orf8077*, *rkpT2* géneknek sem a KPS bioszintézisében, sem a fágfertőzésben, sem a szimbiózisban nincs szerepe. Ennek alapján azt reméltük, hogy az *rkpY* mutánsok által termelt ismeretlen LMW poliszacharid (LMW PS) szintézisében lehetnek fontosak, ezért kettős mutánsok létrehozása volt a cél a továbbiakban.

Az *rkpZ* gén részt vesz az LMW poliszacharid termelésében

Az *rkp-1*, *rkp-2*, és *rkp-3* régió reprezentatív génjeiben mutáns *S. meliloti* törzseket hoztunk létre, mely már tartalmazott *rkpY* háttér-mutációt. Kezdetben az feltételeztük, hogy az *rkpY* mutánsok által termelt LMW poliszacharid a K_{R5} antigén prekursora. Ha a feltevésünk igaz, akkor a kettős mutáns baktériumok nem lesznek képesek az LMW PS termelésére. A kísérleti eredmények alapján, egyetlen K_{R5} antigén szintézisben esszenciális *rkp* gén mutációja sem befolyásolja az *rkpY* mutánsok LMW poliszacharid termelését, kivéve az *rkpZ* gént. Ezek alapján arra következtettünk, hogy az említett ismeretlen szerkezetű poliszacharid nem pszeudaminsav vagy glükuronsav alegységekből áll.

Ezzel szemben az *rkpZ-rkpY* kettős mutáns láthatóan nem termelt semmilyen LMW PS jellegű poliszacharidot, tehát befolyásolja annak termelését. Az *S. meliloti* 41 törzsben az *rkpZ* gén az egyetlen, mely felelős a K_{R5} antigén polimerizációjáért. Azonban az *S. meliloti* 1021 törzs két paralóg *rkpZ* génnel rendelkezik, melyek felelősek a Kdo homopolimer (oligoKdo) szintéziséért. Kézenfekvő volt feltételezni, hogy 1) az *rkpY* mutáns RM41 törzsek által termelt LMW PS valójában oligoKdo, 2) az RkpY fehérje funkciója, hogy gátolja az oligoKdo szintézist.

Az RkpY gátolja a polyKDO termelést *S. meliloti* 1021 törzsben

Az *S. meliloi* 1021 genom szekvenciájában nem találtunk semmilyen *rkpY* homológ gént, ezért, hogy megvizsgáljuk milyen hatással van a poliszacharid termelésre, a gént vad típusú *S. meliloi* 1021 baktériumba juttatuk be. A vad típusú *rkpY* gént konjugatív plazmidba építettük, mely konstrukció bizonyítottan funkcionáló gént eredményezett (az *rkpY* mutációkat képes volt komplementálni). A DOC-PAGE elemzés alapján a *S. meliloti* 1021 (*rkpY*⁺) baktérium mintázata eltért a vad típustól. Míg a 1021 törzs jelentős mennyiségű oligoKdo-t termelt, mint LMW PS, addig az *rkpY* jelenléte szignifikánsan lecsökkentette azt. Ennélfogva, az *S. meliloti* 41 törzsből származó *rkpY* gén képes gátolni a polyKdo szintézisét *S. meliloti* 1021 törzsben.

A DOC-PAGE elemzések alátámasztására és a különböző mutánsok által termelt poliszacharidok pontos szerkezetének bizonyítására, analitikai vizsgálatokat végeztünk Verena Poinot (Université Paul Sabatier, Toulouse) együttműködése eredményeként. Az eredmények alapján a vad típusú *S. meliloti* 41 baktérium a K_{R5} antigén mellett lipidált Kdo homopolimert (lipo-polyKdo) is termel kis mennyiségben. Bebizonyosodott, hogy az *rkpY* mutáns nem termel

K_R5 antigént, viszont KDO homopolimert igen, mely nem rendelkezik lipid végekkel. Az *rkpY-rkpZ* kettős mutáció révén a KDO termelése is megszűnik, ahogyan az várható volt, továbbá *S. meliloti* 1021 törzsben az RkpY fehérje jelentősen megzavarja a KDO szintézisét és csökkenti annak mennyiségét is. Lényegében a genetikai megközelítésünk és feltételezéseink bizonyítást nyertek az elemzés segítségével. A poliszacharid bioszintézis folyamatok és génfunkciók pontos megértése azonban további részletes tanulmányozást igényelnek.

Az *rkp-3* régió törzsspecifikus génjeinek, illetve az *rkpY* génnek köszönhetően, melyek horizontális géntranszfer útján épültek be a genomba, az *S. meliloti* 41 baktérium egy olyan kapszuláris poliszacharidot termel, mely egyfajta előnyt biztosíthat a többi rhizobiummal szemben a szimbiózisban és a fágrezisztenciában. Annak ellenére, hogy a K_R5 antigén bioszintézis apparátusa előfeltétele a *16-3* fágfertőzésnek, a többi rhizobiofágot gátolja ebben, ahogyan kísérleteink is mutatják. Érdemes megjegyezni, hogy a bakteriofágok jelentős szelekciót biztosítanak az új KPS gének horizontális géntranszfere során, amely a kapszuláris poliszacharidok sokféleségét növelheti.

ÚJ EREDMÉNYEK

- Munkánk során kiderült, hogy a *16-3* fág receptora nem a kapszuláris poliszacharid.
- Azonosítottunk olyan KPS bioszintézis fehérjéket (RkpM, RkpZ, RkpY), melyek hatással vannak a fágfertőzésre. Az eredmények alapján feltételezzük, hogy a fágreceptor egy fehérje komplex, melynek alkotói az RkpY, RkpM fehérje, valamint erre közvetve hatással lehet az RkpZ fehérje is.
- Meghatároztuk az *rkpY* gén környezetének DNS szekvenciáját, mellyel a teljes *rkp-3* régió (25024 bp) bázissorrendje ismertté vált. Az újonnan meghatározott szekvencián feltételezett géneket azonosítottunk számítógépes elemzéssel (*orf7343*, *orf8077*, *rkpT*).
- Mutánsok létrehozásával kimutattuk, hogy az *orf7343*, *orf8077*, *rkpT* géneknek sem a KPS bioszintézisében, sem a fágfertőzésben, sem a szimbiózisban nincs szerepe.
- Genetikai eszközökkel bizonyítottuk, hogy az *rkpY* mutáns által temelt LMW poliszacharid nem glükuronsav vagy pszeudaminsav alegységekből áll, valamint azt is, hogy *rkpZ* génnek befolyása van a szintézisére.
- Kimutattuk, hogy RkpY fehérje lényeges a törzsspecifikus K_R5 antigén szintézisében, valamint az *rkpY* gátolja a KDO homopolimer termelését *S. meliloti* 1021 baktériumban.

NÉHÁNY FONTOSABB IRODALOM

- Chataigné G., F. Couderc, and V. Poinso. 2008. Polysaccharides analysis of sinorhizobial capsids by on-line anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection and mass spectrometry coupling. *J Chromatogr A*. 1185:241-250.
- Fraysse, N., F. Couderc, and V. Poinso. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem*. 270:1365-1380.
- Kereszt, A., E. Kiss, B. Reuhs, R.W. Carlson, A. Kondorosi, and P. Putnoky. 1998. Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and the invasion of the symbiotic nodule: *rkpK* gene encodes for a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol*. 180:5426-5431.
- Kiss, E., A. Kereszt, F. Barta, S. Stephens, B. Reuhs, L., A. Kondorosi, and P. Putnoky. 2001. The *rkp-3* gene region of *Sinorhizobium meliloti* Rm41 contains strain-specific genes that determine K antigen structure. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:1395-1403.
- Petrovics G., Putnoky P., Reuhs B., Kim J., Thorp T. A., Noel K. D., Carlson R. W., and Kondorosi A. 1993. The presence of a novel type of surface polysaccharide in *Rhizobium meliloti* requires a new fatty acid synthase-like gene cluster involved in symbiotic nodule development. *Mol. Microbiol*. 8:1083-1094.
- Putnoky, P., G. Petrovics, A. Kereszt, E. Grosskopf, D.T.C. Ha, Z. Banfalvi, and A. Kondorosi. 1990. *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide and exopolysaccharide can have the same function in the plant-bacterium interaction. *J. Bacteriol*. 172:5450-5458.
- Sharypova L. A., G. Chataigné, N. Fraysse, A. Becker, and V. Poinso. 2006. Overproduction and increased molecular weight account for the symbiotic activity of the *rkpZ*-modified K polysaccharide from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Glycobiol*. 16:1181–1193.

PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Putnoky, P., Deák, V., Békási, K., **Pálvölgyi, A.**, Maász, A., Palágyi, Z., Hoffmann, G., Kerepesi, I. (2004): H protein of bacteriophage 16-3 and RkpM protein of *Sinorhizobium meliloti* 41 are involved in phage adsorption. **J. Bacteriol.** 186:1591-1597. (IF: 4.146)
2. **Pálvölgyi, A.**, Deák, V., Poinso, V., Nagy, T., Nagy, E., Kerepesi, I. and P. Putnoky. (2009): Genetic Analysis of the *rkp-3* Gene Region in *Sinorhizobium meliloti* 41: *rkpY* Directs Capsular Polysaccharide Synthesis to KR5 Antigen Production. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 22: 1422-1430. (IF: 4.275).

Az értekezés témájában bemutatott konferencia anyagok

1. **Pálvölgyi Adrienn**, Deák Veronika, Hoffmann Gyula, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter: A kapszuláris poliszacharid bioszintézise és a 16-3 fágreceptor, V. Magyar Genetikai Kongresszus Siófok, 2003. április 13-15. (poszter)
2. Deák Veronika, **Pálvölgyi Adrienn**: A kapszuláris poliszacharid bioszintézise és a 16-3 fágreceptor. XXVI. Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Biológiai Szekció, Genetika Tagozat (Szeged, 2003. április 14-17.) – **II. helyezés.** (előadás)
3. Putnoky Péter, Deák Veronika, **Pálvölgyi Adrienn**, Békási Krisztina, Maász Anita: Baktérium – bakteriofág felismerésben részt vevő gének azonosítása, „A DNS 50 éve”- Magyar Tudományos Akadémia Pécsi Területi Bizottsága, Biológiai Szakbizottság rendezvénye, Pécs, 2003. (előadás)
4. Nagy Tibor, Deák Veronika, **Pálvölgyi Adrienn**, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter: Az *rkpRST* gének és a kapszuláris poliszacharid bioszintézis *Sinorhizobium meliloti* baktériumban, VI. Magyar Genetikai Kongresszus Eger, 2005. április 10-12. (poszter)
5. Deák Veronika, **Pálvölgyi Adrienn**, Buzás Zsuzsanna, Papp Péter, Orosz László, Putnoky Péter: 16-3 rhizobiofág *h* régiójának mutációs elemzése, Genetikai Műhelyek Magyarországon VI. minikonferencia, MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged, 2007. szeptember 7. (előadás)
6. **Pálvölgyi Adrienn**, Nagy Tibor, Deák Veronika, Nagy Enikő, Kerepesi Ildikó, Putnoky Péter: Az *rkpY* a Kdo-homopolimer bioszintézis szupresszora *Sinorhizobium meliloti*-ban, Genetikai Műhelyek Magyarországon VII. minikonferencia, MTA Szegedi Biológiai Központ, Szeged, 2008. szeptember 12. (előadás)

A disszertáció megtekinthető: <http://www.ttk.pte.hu/biologia/phd/phdfok.htm>